
EKSPRESI COX-2 SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK METANOLIK GETAH BIDURI PADA GINGIVA TIKUS WISTAR

(EXPRESSION OF COX-2 AFTER METHANOLIC EXTRACTS OF BIDURI LATEX ADMINISTRATION ON GINGIVAL WISTAR RAT)

Zahara Meilawaty

Bagian Biomedik
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember
Jl. Kalimantan No.37 Jember
E-mail: zhr_mel@yahoo.com

Abstract

Inflammation is a living organism's tissue reaction to all kinds of wound. Inflammation can cause the increasing of cyclooxygenase enzyme on the wounded area. Biduri is a bush plant. The extracts of this plant can be used as antiinflammation, and also help wound healing. This research aimed to investigate the effect of systemic administration methanolic extracts of latex of Biduri (*C. gigantea*) on the expression of COX-2 in inflammation model by immunohistochemical on the experimental animal (Wistar rat). The amount of samples used in this study was 51 male rats, three month age with body weight 200-300 grams, which divided into 4 groups. Three rats as normal control, which were not given any treatment. The remains, 48 were treated in being wounded on the mucosal gingival mandible into the bone, using punch biopsy (Θ 2,5 mm). After that, the rats divided into three groups, they were; (1) twelve as the negative control, were not given medicine; (2) twelve as the positive control, were given ibuprofen 108 mg/kg b.w.; (3) twenty four as the treated group, twelve were given extracts of biduri latex 50 mg/kg b.w. and twelve were given extracts of biduri latex 500 mg/kg b.w. On the 2nd and 4th day's decapitation was done to take the mandible, after that the immunohistochemical observation was done. The result showed that the COX-2 express on the 4th day was increased in all groups. In conclusion, the methanolic extracts of biduri latex did not inhibit the expression of COX-2.

Keywords: methanolic extracts, expression of COX-2, wistarat

Abstrak

Inflamasi adalah reaksi jaringan hidup terhadap semua bentuk jejas. Inflamasi dapat menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi enzim siklooksigenase di daerah luka. Biduri merupakan tanaman perdu. Ekstrak tanaman ini dapat digunakan sebagai antiinflamasi, dan juga dapat mempercepat penyembuhan luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian secara sistemik ekstrak metanolik getah biduri (*C. gigantea*) terhadap ekspresi COX-2 pada model inflamasi secara imunohistokimia pada binatang percobaan (tikus putih *strain wistar*). Jumlah sampel penelitian adalah 51 ekor tikus putih jantan, umur 3 bulan dengan berat badan 200-300 gram, yang dibagi menjadi 4 kelompok besar. Tiga ekor tikus putih diambil secara acak sebagai kelompok normal, yaitu tidak diberi perlakuan apapun. Empat puluh delapan ekor tikus putih sisanya dibuat perlakuan pada mukosa gingiva rahang bawah menggunakan *punch biopsy* (Θ 2,5 mm) sampai menyentuh tulang, selanjutnya dibagi lagi menjadi 3 kelompok secara acak; yaitu (1) kontrol negatif (-) sebanyak 12 ekor, tidak diberi obat; (2) kontrol positif (+) sebanyak 12 ekor, diberi ibuprofen dosis 108 mg/kg BB ; (3) kelompok perlakuan sebanyak 24 ekor, 12 ekor diberi ekstrak getah biduri 50 mg/kg BB, dan 12 ekor diberi ekstrak getah biduri 500 mg/kg BB. Pada hari ke-2 dan ke-4 dilakukan dekapitasi untuk diambil rahang bawahnya, selanjutnya dilakukan pengamatan imunohistokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi COX-2 pada hari ke-4 mengalami peningkatan pada semua kelompok. Kesimpulannya, pemberian ekstrak getah biduri tidak dapat menghambat ekspresi COX-2.

Kata kunci: ekstrak metanolik, COX-2, tikus putih

PENDAHULUAN

Perlukaan yang banyak terjadi di kedokteran gigi adalah luka pada jaringan lunak yang disebabkan karena pencabutan gigi. Respons awal semua jaringan hidup terhadap semua bentuk luka adalah inflamasi, yaitu suatu proses yang melibatkan reaksi vas-kuler, humoral, dan seluler pada tempat terjadinya luka. Kerusakan sel yang dihubungkan dengan proses inflamasi menyebabkan leukosit yang terdapat pada membran sel mengeluarkan enzim lisosomal, asam arakidonat, dan disintesisnya berbagai eikosa-noid.¹

Proses inflamasi diperlukan sebagai pertahanan tubuh terhadap mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh, dan penyembuhan luka yang membutuhkan komponen seluler untuk membersihkan debris pada lokasi cedera, serta diperlukan untuk meningkatkan perbaikan jaringan. Fase inflamasi ini biasanya berlangsung selama lima hari setelah terjadinya cedera pada jaringan.²

Inflamasi adalah reaksi jaringan hidup terhadap semua bentuk jejas, dalam proses ini ikut berperan pembuluh darah, saraf, cairan, dan sel-sel inflamasi di tempat jejas. Proses inflamasi meliputi pemusnahan, pelarutan atau pembatasan terhadap agen penyebab jejas. Inflamasi disebabkan oleh eukasinoid dan sitokin yang dilepaskan oleh jaringan yang terluka atau terinfeksi, salah satunya adalah prostaglandin yang dapat menyebabkan demam dan dilatasi pembuluh darah yang berhubungan dengan inflamasi. Lepasnya prostaglandin ke daerah luka menyebabkan meningkatnya enzim siklooksigenase di daerah tersebut.^{3,4}

Penggunaan obat antiinflamasi nonsteroid (AINS) sangat efektif untuk mengurangi inflamasi dan rasa sakit. Enzim siklooksigenase (*COX*) merupakan target utama obat antiinflamasi nonsteroid, *COX* merupakan enzim yang berperan dalam merubah asam arakidonat menjadi prostaglandin yang bertanggungjawab terhadap terjadinya inflamasi, rasa sakit, proliferasi sel dan respons biologis lainnya. Semua obat AINS, salah satunya ibuprofen bekerja sebagai antiinflamasi dengan menghambat sintesis prostaglandin dengan cara menghambat enzim *COX* yang mengkatalis reaksi asam arakidonat menjadi senyawa endoperoxidase. Ibuprofen merupakan derivat asam propionat, salah satu kelompok obat AINS *nonselective COX inhibitor* yang biasa digunakan. Obat ini diindikasikan untuk luka pada jaringan lunak, fraktur, ekstraksi gigi, vasektomi, pasca melahirkan, pasca operasi; dapat menekan terjadinya inflamasi. Tetapi, penggunaan obat AINS dapat menimbulkan efek samping, di antaranya

dapat menyebabkan terjadinya perdarahan gastro-intestinal, memperlama waktu perdarahan, serta dapat merusak fungsi ginjal.⁵⁻⁷ Oleh karena itu, masih perlu dicari bahan alam atau bahan lain sebagai obat antiinflamasi dengan efek samping yang minimal.

Penggunaan tanaman atau ekstrak tanaman untuk pengobatan telah berlangsung beribu-ribu tahun, dan herbalisme serta obat rakyat baik yang kuno maupun modern merupakan sumber terapi yang banyak gunanya. Beberapa tanaman obat yang dikenal di Indonesia ada yang dapat digunakan sebagai obat alternatif untuk antiinflamasi dan sakit gigi, salah satunya adalah tanaman biduri (*C. gigantea*). Tanaman ini merupakan jenis tumbuhan semak liar yang banyak ditemukan di daerah ber musim kemarau panjang, termasuk di Indonesia.⁸ Getah biduri mengandung enzim bakteriolitik, kalotropin (enzim proteolitik yang menyerupai papain) yang memperlihatkan anti tumor terhadap sel epidermis karsinoma nasofaring, dan juga berperan pada proses inflamasi serta juga dapat menurunkan waktu koagulasi plasma sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan.^{9,10} Getah biduri dapat digunakan untuk menyembuhkan *ulser* dan mempercepat penyembuhan.^{11,12} Walaupun demikian mekanisme kerja getah biduri itu sendiri terhadap ekspresi enzim *COX-2*, yaitu enzim yang berperan pada saat terjadinya inflamasi sampai saat ini belum diketahui.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian secara sistemik ekstrak metanolik getah biduri terhadap ekspresi *COX-2* pada model inflamasi secara imunohistokimia pada gingiva hewan coba.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni, menggunakan 51 ekor tikus putih *strain wistar*, umur 3 bulan dengan berat 200-300 gram. Penelitian ini telah mendapatkan kelaikan etik (*ethical clearance*) dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

Tanaman biduri diperoleh dari daerah sekitar candi Prambanan Yogyakarta. Tanaman diidentifikasi di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol. Getah biduri diperoleh dengan cara memotong batangnya. Getah yang didapat direndam dalam metanol, disimpan terlindung dari cahaya langsung selama 3 hari, setelah itu getah disaring menggunakan kertas saring. Hasil penyaringan di-

uapkan di atas kompor menggunakan *water bath* sampai diperoleh ekstrak kental. Proses ini memerlukan waktu selama kurang lebih 5 jam.¹³

Tikus dianestesi dengan menggunakan ketalar secara intra muskular, kemudian perlakuan dibuat dengan cara melakukan *punch biopsy* (Θ 2,5 mm) pada mukosa gingiva rahang bawah. *Punch biopsy* ditekan sambil diputar pada mukosa gingiva sampai menyentuh tulang.

Tikus putih terlebih dahulu diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama 1 minggu, diberi pakan standar dan minum *ad libitum*. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok besar secara acak, yaitu (1) kelompok normal, tidak diberi perlakuan apapun; (2) kontrol negatif (-) sebanyak 12 ekor tikus putih, dipunch *biopsy* tetapi tidak diberi obat; (3) kontrol positif (+) sebanyak 12 ekor tikus putih, dipunch *biopsy* dan diberi ibuprofen dengan dosis 108 mg/kg BB; (4) kelompok perlakuan sebanyak 24 ekor tikus putih, 12 ekor dipunch *biopsy* lalu diberi ekstrak getah biduri 50 mg/kg BB, dan 12 ekor dipunch *biopsy* lalu diberi ekstrak getah biduri 500 mg/kg BB. Pada hari ke-2 dan ke-4, dilakukan dekapitasi untuk diambil rahang bawahnya, selanjutnya dibuat sediaan jaringan untuk pengamatan imunohistokimia.

HASIL

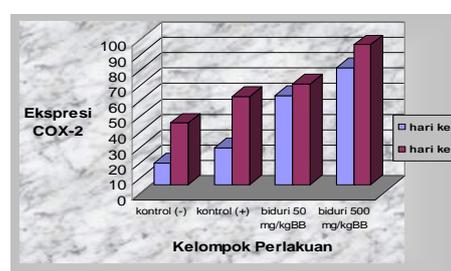
Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin lama waktu pengamatan dan semakin besar dosis ekstrak biduri (500mg/kg BB) maka rerata ekspresi COX-2 yang terlihat semakin besar (Tabel 1). Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil uji Anova menunjukkan bahwa ekspresi COX-2 pada masing-masing perlakuan mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), membuktikan

bahwa ekstrak getah biduri berpengaruh terhadap ekspresi COX-2 (Tabel 2). Hasil analisis dengan LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada semua kelompok perlakuan, kecuali pada kelompok kontrol positif (+) hari ke-4 dengan kelompok biduri 50 mg/kg BB hari ke-2 (Tabel 3).

Tabel 1. Rerata dan simpangan baku ekspresi COX-2 berdasarkan kelompok perlakuan dan waktu dekapitasi

Waktu Dekapitasi	Rerata dan Simpangan baku ekspresi COX-2			
	Kontrol Negatif (-)	Kontrol positif (+)	Biduri 50 mg/kg BB	Biduri 500 mg/kg BB
Hari ke-2	19,33 $\pm 1,527$	29,00 $\pm 1,73$	63,00 $\pm 2,64$	81,33 $\pm 1,52$
Hari ke-4	45,33 $\pm 6,02$	62,67 $\pm 8,15$	71,00 $\pm 1,73$	96,33 $\pm 0,57$



Gambar 1. Gambaran rerata ekspresi COX-2 pada jaringan gingiva tikus putih yang terinflamasi pada masing-masing kelompok

Tabel 2. Hasil uji *two-way Anova* efek pemberian secara sistemik ekstrak metanolik getah biduri terhadap ekspresi COX-2 pada model inflamasi

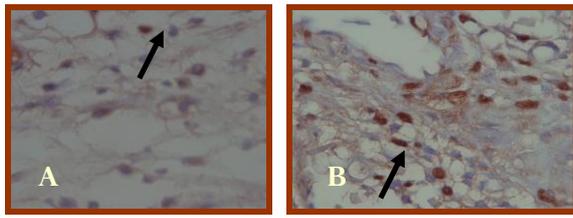
	F	Sig.
Waktu dekapitasi	169.901	0.000
Kelompok	243.646	0.000
Waktu dekapitasi * kelompok	12.928	0.000

Tabel 3. Rangkuman hasil uji LSD efek pemberian secara sistemik ekstrak metanolik getah biduri terhadap ekspresi COX-2 pada model inflamasi

	K(-)2	K(-)4	K(+)2	K(+)4	B(50) 2	B(50) 4	B(500) 2	B(500) 4
K(-)2		-26.0000*	-9.6667*	-43.3333*	-43.6667*	-51.6667*	-62.0000*	-77.0000*
K(-)4			16.3333*	-17.333*	-17.6667*	-25.6667*	-36.0000*	-51.0000*
K(+)2				-33.6667*	-34.0000*	-42.0000*	-52.3333*	-67.3333*
K(+)4					-3.3333	-8.3333*	-18.6667*	-33.6667*
B(50) 2						-8.0000*	-18.3333*	-33.3333*
B(50) 4							-10.3333*	-25.3333*
B(500) 2								-15.0000*
B(500) 4								

Keterangan: K(-) 2 : kontrol negatif (-) hari ke-2
 K(-) 4 : kontrol negatif (-) hari ke-4
 K(+) 2 : kontrol positif (+) hari ke-2
 K(+) 4 : kontrol positif (+) hari ke-4
 B(50) 2 : biduri 50 mg/kg BB hari ke-2
 B(50) 4 : biduri 50 mg/kg BB hari ke-4
 B(500) 2 : biduri 500 mg/kg BB hari ke-2
 B(500) 4 : biduri 500 mg/kg BB hari ke-4
 * : signifikansi

Secara mikroskopis gambaran ekspresi *COX-2* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Gambaran mikroskopis ekspresi *COX-2* kelompok biduri 500 mg/kg BB, pembesaran 1000x. Tanda panah menunjukkan ekspresi *COX-2* pada hari ke-2 (A) lebih sedikit daripada hari ke-4 (B)

PEMBAHASAN

Proses inflamasi atau kaskade inflamasi dimulai dari suatu stimulus yang akan mengakibatkan kerusakan sel, sebagai reaksi terhadap kerusakan maka sel tersebut akan melepaskan beberapa fosfolipid yang di antaranya adalah asam arakidonat. Setelah asam arakidonat tersebut bebas beberapa enzim akan segera diaktifkan, di antaranya lipoksigenase dan siklooksigenase. Enzim siklooksigenase mengubah asam arakidonat ke dalam bentuk yang tidak stabil (hidroperoksid dan endoperoksid) yang selanjutnya dimetabolisir menjadi prostaglandin, prostasiklin, dan tromboksan. Keadaan inflamasi membuat ekspresi *COX* akan meningkat, baik *COX 1* maupun *COX-2*. *COX 1* merupakan enzim yang ditemukan di banyak sel dan jaringan normal, sedangkan *COX-2* baru akan terbentuk setelah diinduksi oleh sitokin dan mediator inflamasi lainnya di daerah inflamasi.¹⁴

Penelitian yang dilakukan oleh Arya¹⁵ menjelaskan bahwa ekstrak getah *Calotropis procera* (tumbuhan yang satu jenis dengan biduri) diketahui mempunyai efek antiinflamasi yaitu dengan menghambat mediator-mediator inflamasi seperti bradikinin, histamin, dan prostaglandin. Getah biduri (*C. Gigantea*) sama seperti getah *C. procera* diketahui memiliki kandungan kalotropin, sejenis enzim proteolitik yang hampir sama dengan papain yang berkhasiat sebagai antiinflamasi.^{9,12} Daya proteolitik dalam asam amino pada enzim protease dapat digunakan sebagai obat anti bengkak, selain itu protease merupakan golongan enzim yang relatif kuat. Enzim proteolitik getah biduri termasuk dalam jenis sistein protease, sebagaimana enzim protease dari kebanyakan tanaman (papain dan bromelin).^{10,16}

Enzim proteolitik bekerja dengan memotong rantai protein, apabila tubuh atau jaringan mengalami luka maka tubuh akan merespons terjadinya

inflamasi. Inflamasi yang berlebihan akan menyebabkan proses penyembuhan menjadi terhambat. Enzim proteolitik dapat mengurangi inflamasi yang terjadi dengan menetralkan bradikinin dan eukasinoid *pro-inflammatory* ke level dimana proses repair dan regenerasi jaringan yang luka dapat dimulai, serta dapat memicu terjadinya koagulasi darah.^{10,17}

Dari hasil uji KLT diketahui bahwa terdapat glikosida dan steroid dalam kandungan ekstrak metanol getah biduri. Glikosida ini mempunyai struktur dan kelarutan yang sama dengan saponin steroid. Senyawa ini diketahui juga dapat menghambat dehidrogenase jalur prostaglandin. Selain itu steroid juga dapat menghambat sintesis leukotrien melalui penghambatan enzim lipoksigenase yang juga dikeluarkan pada saat inflamasi.¹

Hasil penelitian yang terlihat pada Tabel 1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi *COX-2* setelah pemberian ekstrak biduri menunjukkan kecenderungan semakin meningkat dengan semakin lamanya waktu pengamatan. Uji *two-way Anova* (Tabel 2) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak getah biduri 50 dan 500 mg/kg BB mempunyai pengaruh yang bermakna terhadap peningkatan ekspresi *COX-2*. Gambar 1 juga memperlihatkan bahwa ekstrak getah biduri 50 dan 500 mg/kg BB mempunyai pola yang sama dengan ibuprofen dalam peningkatan ekspresi *COX-2*. Hal ini juga menunjukkan bahwa ibuprofen, ekstrak getah biduri 50 dan 500 mg/kg BB tidak menghambat ekspresi *COX-2* pada inflamasi yang terjadi. Hasil ini tidak sesuai dengan hipotesis penulis yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak getah biduri dapat menghambat ekspresi *COX-2* pada inflamasi.

Berdasarkan apa yang diuraikan, penulis mengasumsikan bahwa kemungkinan mekanisme kerja biduri dalam menghambat inflamasi adalah dengan menghambat biosintesis prostaglandin melalui jalur selain *COX-2*, sehingga ekspresi *COX-2* nya tidak mengalami penurunan setelah pemberian ekstrak getah biduri. Secara farmakologis, kemungkinan lain yang menyebabkan tidak terhambatnya *COX-2* adalah mungkin karena kandungan steroid yang juga dimiliki oleh biduri, sehingga efek antiinflamasi yang dimiliki biduri mirip seperti obat antiinflamasi steroid, yaitu dengan menghambat leukotrien melalui jalur lipoksigenase. Hal lain yang mungkin dapat menghambat terjadinya inflamasi setelah pemberian ekstrak getah biduri adalah adanya *growth factor* dan enzim bakteriolitik dalam getah biduri. Enzim bakteriolitik dapat mencegah dan mematikan mikroorganisme yang ada pada daerah inflamasi sehingga dapat menghambat inflamasi dan akhirnya dapat mempercepat penyembuhan luka.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak metanolik getah biduri tidak menurunkan ekspresi COX-2 pada model inflamasi. Namun, masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek pemberian ekstrak metanolik getah biduri terhadap *mRNA COX-2*, ekspresi *COX-1* dan *COX-3*, serta efeknya terhadap enzim lipoksigenase untuk mengetahui mekanisme kerja getah biduri sebagai antiinflamasi.

Daftar Pustaka

1. Katzung BG. Basic & Clinical pharmacology, 9th ed, Toronto: Mc Graw Hill, 2004: 576-87.
2. Baratawidjaja KG. Imunologi dasar, Edisi ke-7, Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2006: 140.
3. Robbins SL. Buku ajar patologi, Alih Bahasa: Staf Pengajar Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Edisi ke-7, Jakarta: EGC, 2007: 35-66.
4. Raveinal. Inflamasi respon awal penyembuhan, Ethical Digest Semijurnal Farmasi dan Kedokteran, 2007, No. 39: 52-55.
5. Tripathi KD. Essentials of medical pharmacology, 5th ed, New Delhi: Jaypee Brothers, 2003: 156-84.
6. Lee Y, Rodriguez C, Dionne RA. 2005, The role of COX-2 in acute pain and the use of selective COX-2 Inhibitors for Acute Pain Relief, <http://www.bentham.org>(8 Maret 2011).
7. Vardar S. The administration of non steroidal anti-inflammatory drugs and selective cyclooxygenase-2 inhibitors in dentistry, <http://www.bentham.org>, (8 Maret 2011).
8. Dalimartha S. Atlas tumbuhan obat Indonesia, Jakarta: Trubus Agriwidya, 2005:11-16.
9. Muscle Rub J. Herbal Monograph, <http://www.himalayahealthcare.com>, (20 Maret 2011).
10. Rajesh R, Gowda CDR, Nataraju A, Dhanan-jaya, BL, Kemparaju K., Vishwanath, BS. 2005, Procoagulant activity of Calotropis gigantea latex associated with fibrin (ogen)olytic activity, <http://www.sciencedirect.com>, (14 Maret 2011).
11. Hariana A. Tumbuhan obat dan khasiatnya. Seri 3, Jakarta: Penebar Swadaya, 2006:160-1.
12. Schmidt, R.J., Asclepiadaceae, <http://www.bodd.cf.ac.uk>, (24 Maret 2011).
13. Departemen Kesehatan RI. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat, Departemen Kesehatan RI Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Jakarta, 2000: 10-12.
14. Goodman, Gilman, Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed, Toronto: Mc Graw Hill, 2001: 687-71.
15. Arya S, Kumar VL... Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of calotropis procera against different mediators of inflammation, <http://www.hindawi.com> (3 April 2011).
16. Diwan JJ. Protein degradation, <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem> (3 April 2011).
17. Baron J. Enzymes: Part 3 of 3 <http://www.rd.bcentral.com> (3 April 2011).